無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

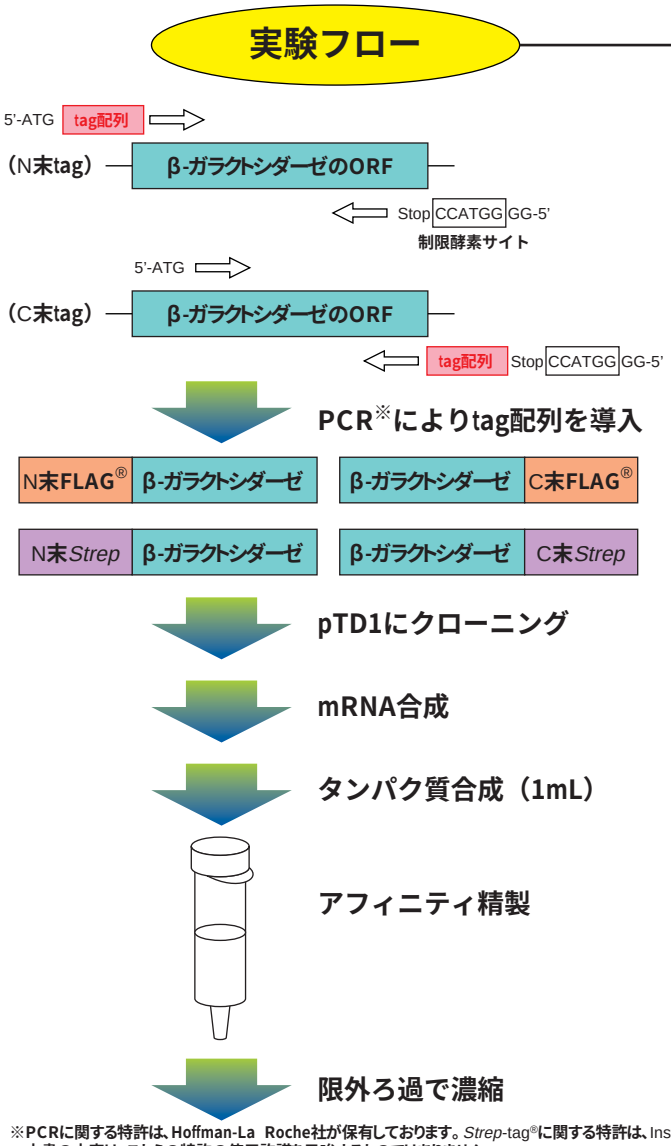
C297-0330C

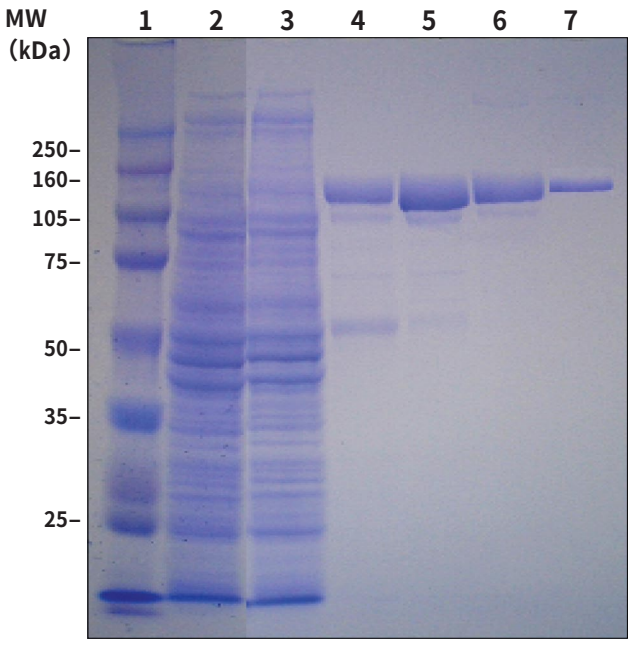
アプリケーションデータ 2

[合成タンパク質の精製例]

タンパク質の詳細な機能解析には、発現タンパク質を純化する必要があります。簡便にタンパク質を精製するためにtag精製の検討を行いました。β-ガラクトシダーゼのN末端およびC末端にFLAG®-tagまたは*Strep*-tag®を導入した発現ベクターを作製し、それぞれのアフィニティカラムにて精製を行いました。

■ 精製タンパク質：β-ガラクトシダーゼ（116 kDa）





1．分子量マーカー
2．反応前
3．反応5時間後
4．N末 FLAG®-tag 精製
5．C末 FLAG®-tag 精製
6．N末 *Strep* -tag® 精製
7．C末 *Strep* -tag® 精製

FLAG®-tag：Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys
FLAG®はSigma-Aldrich社の登録商標です。

Strep-tag®：Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys
Strep-tag®はIBA社の登録商標です。

※PCRに関する特許は、Hoffman-La Roche社が保有しております。*Strep*-tag®に関する特許は、Institut für Bioanalytik社が保有しております。
本書の内容は、これらの特許の使用許諾を示唆するものではありません。

裏面の方法もご参照ください。

図1．SDS-PAGE

FLAG®-tag、*Strep*-tag®いずれの場合においてもtag精製により非常に明瞭なバンドとして検出されました。また、反応液1mLあたり、10μg以上の目的タンパク質が取得されました（裏面表1参照。本製品1キットでは、20μg以上の収量が期待出来ます）。

以上より、tag配列を導入することで、非常に簡便に目的タンパク質を取得出来る一例を示すことが出来ました。

無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

方 法

・タンパク質合成

PCRによりtag配列を導入した後、キット付属の取扱い説明書に従い、pTD1にクローニングした。

・mRNA合成・タンパク質合成

キット付属の取扱い説明書に従ってmRNAを合成した後、1mLの反応スケールでタンパク質合成を行った。

・タンパク質の精製

FLAG®-tag：反応液をゲルろ過で脱塩後、TBS1※1で平衡化したAnti-FLAG® M2 Agarose from mouse (0.5mL、SIGMA社製)に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、100μg/mLのFLAG® peptide (SIGMA社製)で溶出した。

Strep-tag®：TBS2※2で平衡化した*Strep*-Tactin® Superflow(0.5mL、QIAGEN社製)に反応液を添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、2mM desthiobiotinで溶出を行った。

それぞれの溶出画分を限外ろ過膜(MWCO = 10kDa)で濃縮した。

※1 TBS1: 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH8.0　※2 TBS2: 50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH8.0

・活性測定

β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer (Promega社製)を用いて行った。

結 果

電気泳動の結果、*Strep*-tag®では単一なバンドとして検出され、精製後の比活性もN末tagとC末tagで一致しておりました。FLAG®-tagでは、約50kDaの位置に抽出液由来と思われるバンドが検出されました。精製後の比活性も*Strep*-tag®と比較すると低い値でしたが、C末tagでは非常に収率が良く、約80%の活性を回収出来ました。結果には示しておりませんが、複数種のタンパク質において同様の結果が得られることを確認しております。

以上の結果から、FLAG®-tagは、目的タンパク質を回収率良く取得する場合、また*Strep*-tag®は、目的タンパク質を高純度に取得する場合に適すると結論しました。

表1．精製テーブル

		活性（U）		収率 (%)	収量 (μg)	比活性※ (U/μg)
		反応液	精製後			
FLAG®	N末tag	41	18	43	27	0.7
	C末tag	52	40	77	38	1.0
Strep	N末tag	54	24	45	17	1.4
	C末tag	45	9	20	6.4	1.4

※アフィニティ精製後の比活性

技術に関するお問合せは・・・

分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット

TEL　(075) 823-1351
WEB　https://solutions.shimadzu.co.jp/form/biotech/contact.html
E-Mail　t-direct@shimadzu-biotech.jp

Transdirect *insect cell* (P/N 292-30000-91)

■キット内容
- Insect Cell Extract（黄）×5本
- Reaction Buffer（青）×1本
- 4mM Methionine（赤）×1本
- 0.5μg/μL Control DNA（白）×1本
- 0.5μg/μL pTD1 Vector（緑）×1本
- 取扱説明書

■反応回数：40回（50μL合成反応系）
■保存温度：−80℃
■価　格：31,185円（税込）

〈ご注意〉・試薬キットロット間の合成量には、多少の差が見られますがご了承ください。
・概観及び仕様は予告なく変更することがありますのでご了承ください。
・本製品の使用は試験研究用のみです。臨床、医薬品・食品製造用途には使用できません。

バルクキット（受注生産のため、詳細はお問い合せください。）

		■価格（税込）
20キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット20 (P/N 292-30000-92)	404,250円
50キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット50 (P/N 292-30000-93)	924,000円
100キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット100 (P/N 292-30000-94)	1,617,000円

バルクキットには、pTD1 VectorとControl DNAは含まれません。

※価格は2008年10月1日現在のものです。
※仕様および価格は改良のため，予告なく変更することがありますので，ご了承ください。

JQA-0376

島津製作所　分析計測事業部　604-8511　京都市中京区西ノ京桑原町1

バイオ・臨床ビジネスユニット
604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1（075）823-1351
http://www.shimadzu-biotech.jp/

取次店

3219-11802-500-IK